

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



RECEIVED

FEB 28 2002

TECH CENTER 1600/2900

Priority document concerning the filing
Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung
of a Patent Application

File reference

Aktenzeichen:

195 48 222.0

Application date

Anmeldetag:

22. Dezember 1995

Applicant/Owner

Anmelder/Inhaber:

Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich/DE

Title

Bezeichnung:

Method for the microbial manufacture of amino-
Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Amino-
säuren durch gesteigerte Aktivität von Export-
carriern

acids by increased activity of export carriers

IPC:

C 12 N, C 12 P, C 07 K

The attached pieces are an accurate and correct representation of the
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.
original documents of this application

München, den 14. Dezember 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Translation of the text of German application 195 48 222.0.

The translation was prepared by the undersigned who certifies that, to the best of his knowledge, it is an accurate translation of the German application.

Klaus J. Bach

Klaus J. Bach, Reg. No. 26832

D e s c r i p t i o n

PROCESS FOR THE MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS
BY BOOSTED ACTIVITY OF EXPORT CARRIERS

The invention relates to a process for the microbial production of amino acids according to claims 1 to 20, export genes according to claims 21 to 26, regulator genes according to claims 27 and 28, gene structures according to claims 29 and 30, vectors according to claims 31 to 33, transformed cells according to claims 34 to 40, membrane proteins according to claims 41 and 42 and uses according to claim 43 and 48.

Amino acids are of high economical interest and there are many applications for the amino acids: for example, L-lysine as well as L-threonine and L-tryptophan are needed as feed additives, L-glutamate as seasoning additive, L-isoleucine, and L-tryosine in the pharmaceutical industry, L-arginine and L-isoleucine as medicine or L-glutamate and L-phenylalanine as a starting substance for the synthesis of fine chemicals.

A preferred method for the manufacture of these different amino acids is the biotechnological manufacture by means of microorganisms; since, in this way, the biologically effective

and optically active form of the respective amino acid is directly obtained and simple and inexpensive raw materials can be used. As microorganisms, for example, *Carynebacterium glutamicum* and its relatives *ssp. flavum* and *ssp lactofermentum* (Liebl et al; Int. J-System Bacteriol (1991) 41:255-260) as well as *Escherichia coli* and related bacteria can be used.

However, these bacteria produce the amino acids only in the amounts needed for their growth such that no excess amino acids are generated and are available. The reason for this is that in the cell the biosynthesis of the amino acids is controlled in various ways. As a result, different methods of increasing the formation of products by overcoming the control mechanisms are already known. In these processes, for example, amino acid analogs are utilized to render the control of the biosynthesis ineffective. A method is described, for example, wherein *Coarynebacterium* strains are used which are resistant to L-tyrosine and L-phenylalanine analogs (JP 19037/1976 and 39517/1978). Also methods have been described in which bacteria resistant to L-lysine and also to L-threonine analogs are used in order to overcome the control mechanisms (EP 0 205 849 B1, UK patent application GB 2 152 509 A).

Furthermore, microorganisms constructed by recombinant DNA techniques are known wherein the control of the biosynthesis has also been eliminated by cloning and expressing the genes which code for the key enzymes which cannot be feed-back inhibited any more. For example, a recombinant L-lysine producing bacterium with plasmid-coded feedback-resistant aspartate kinase is known (EP 0381527). Also, a recombinant L-phenylalanine producing bacterium with feedback resistant prephenate dehydrogenase has been described (JP 124375/1986; EP 0 488 424). In addition, increased amino acid yields have been obtained by overexpression of genes, which do not code for feedback-

sensitive enzymes of the amino acids synthesis. For example, the lysine formation is improved by increased synthesis of the dihydrodipicolinate synthase (EP 0 197 335). Also, the threonine formation is improved by increased synthesis of threonine dehydratase (EP 0 436 886 A1).

Further experiments for increasing the amino acid production aim at an improved generation of the cellular primary metabolites of the central metabolism. In this connection, it is known that the overexpression of the transketolase achieved by recombinant techniques improve the product generation of L-tryptophan, L-tyrosine or L-phenalanine (EP 0 600 463 A2). Furthermore, the reduction of the phosphoenol pyruvate carboxylase activity in *Carynebacterium* provides for an improvement in the generation of aromatic amino acids (EP 0 331 145).

All these attempts to increase the productivity have the aim to overcome the limitation of the cytosolic synthesis of the amino acids. However, as a further limitation basically also the export of the amino acids formed in the interior of a cell into the culture medium should be taken into consideration. As a result, it has been tried to improve this export and, consequently, the efficiency of the amino acid production. For example, the cell permeability of the *Carynebacterium* has been increased by biotin deficiency, detergence or penicillin treatment. However, these treatments were effective exclusively in the production of glutamate, whereas the synthesis of other amino acids could not be improved in this manner. Also, bacteria strains have been developed in which the activity of the secretion system is increased by chemical or physical mutations. In this way, for example, a *Corynebacterium glutamicum* strain has been obtained which has an improved secretion activity and is therefore especially suitable for the L-Lysine production. (DE 02 03 320).

Altogether, the attempts to increase the secretion of amino-acids formed within the cell have all in common that an increase efflux of amino acids on the basis of the selected non-directed and non-specific methods could be achieved only accidentally. Solely in the German patent application No. 195 23 279.8-41, a process is described which provides for a well-defined increase of the secretion of amino acids formed internally in a cell by increasing the expression of genes coding for the import of amino acids. The understanding on which this process was based, that is, that the cell utilizes import proteins for the export of amino acids as well as the fact that, by nature, microorganisms do not generate and release excess amino acids lets one assume that export genes or proteins specific for the amino acid transport do not exist, but that the amino acids are excreted by way of other export systems.

The export systems known so far export poisonous metal ions, toxic antibiotica and higher molecular toxins. These export systems are relatively complex in their structure. Generally, membrane proteins of the cytoplasmic membrane are involved which however cause only a partial reaction of the export so that presumably additional extra cytoplasmic support proteins are needed for the transport (Dinh, T. et al., A family of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria., J. Bacteriol. 1994, 176: 3825-3831). Furthermore, it is known that, with the sec-dependent export system for extra-cellular proteins, at least six different protein components are essential for the export. This state-of-the-art suggests that also the systems, which are responsible for the export of amino acids, but which are not known so far comprise several protein components or respectively, several genes are responsible for the export of amino acids. A hint in this direction could be the various mutants which are defective in the

lysine export as described by Vrylic et al., (J. Bacteriol (1995) 177:4021-4027).

It has now been found surprisingly that only a single specific gene is responsible for the export of amino acids so that, in accordance with the invention, for the first time a method for the microbial manufacture of amino acids is provided wherein clearly the export gene expression and/or the export carrier activity of a microorganism producing amino acids is increased. The increased export expression or respectively, activity of the export carrier resulting from this process leads to an increased secretion rate so that the export of the respective amino acid is increased. The microorganisms so modified also accumulate an increased part of the respective amino acid in the culture medium.

For an increase in the export carrier activity especially the endogenic activity of an amino acid producing microorganism is increased. An increase of the enzyme activity can be obtained for example by an increased substrate consumption achieved by changing the catalytic center or by eliminating the effects of enzyme inhibitors. An increased enzyme activity can also be caused by an increased enzyme synthesis for example by gene amplification or by eliminating factors, which inhibit the enzyme biosynthesis. The endogene export activity is increased preferably by mutation of the endogenic export gene. Such mutations can be generated either in an uncontrolled manner in accordance with classic methods as for example by UV irradiation or by mutation causing chemicals or in a controlled manner by gene-technological methods such as deletion(s) insertion(s) and/or nucleotide exchange(s).

The export gene expression is increased by increasing the number of gene copies and/or by increasing regulatory factors, which positively affect the export gene expression. For exam-

ple, a strengthening of regulatory elements takes place preferably on the transcription level by increasing particularly the transcription signals. This can be accomplished for example in that, by changing the promoter sequence arranged before the structure gene, the effectiveness of the promoter is increased or by completely replacing the promoter by more effective promoters. An amplification of the transcription can also be achieved by accordingly influencing a regulator gene assigned to the export gene as will be explained further below. On the other hand, an amplification of the translation is also possible, for example, by improving the stability of the m-RNA.

To increase the number of gene copies the export gene is installed in a gene construct or, respectively, in a vector, preferably, a vector with a small number of copies. The gene construct includes regulatory gene sequences, which are specifically assigned to the export gene, preferably such sequences, which reinforce the gene expression. The regulatory gene sequences comprise a nucleotide sequence which codes for the amino acid sequence given in table 1 or the nucleotide sequence coding for the allele variations thereof or respectively, a nucleotide sequence 954 to 82 according to table 2 or a DNA sequence which is effective essentially in the same manner.

Allele variations or, respectively, equally effective DNA sequences comprise particularly functional derivatives which can be obtained by deletion(s) insertion(s) and/or substitution(s) of nucleotides of corresponding sequences, wherein however the regulator protein activity or function is retained or even increased: In this way, the effectiveness of the interaction of the regulatory protein to the DNA of the export gene to be regulated can be influenced by mutating the regulatory gene sequence such that the transcription is strengthened and, con-

sequently, the gene expression is increased. In addition, also so-called enhancers may be assigned to the export gene as regulatory sequences whereby, via an improved correlation between RNA polymerase and DNA, also the export gene expression is increased.

For the insertion of the export gene into a gene construct, the gene is preferably isolated from a microorganism strain of the type *Corynebacterium* and, with the gene construct including the export gene, a microorganism strain, especially *Corynebacterium*, producing the respective amino acid is transformed. The isolation and transformation of the respective transport gene occurs according to the usual methods. If a transport gene is isolated and cloned from *Corynebacterium* then for example, the method of homologous complementation of an export defective mutant is suitable (J.Bacteriol. (1995) 177: 4021-4027). If a direct cloning of the structure gene is not possible vector sequences may first be inserted into the transport gene whereupon it is isolated by way of "plasmid rescue" in the form of inactive fragments. For the process according to the invention genes from the *C. glutamicum* ATCC 13032 or *C. glutamicum* ssp. *Flavum* ATCC 14067 or also, *C. glutamicum* ssp. *lacto fermentum* ATCC 13869 are particularly suitable. The isolation of the genes and their in-vitro recombination with known vectors (Appl. Env. Microbial (1989) 55: 684-688; Gene 102 (1991) 93-98) is followed by the transformation into the amino acid producing strains by electroporation (Liebl et al. (1989) FEMS Microbiol Lett. 65; 299-304) or conjugation (Schäfer et al. (1990) J. Bacteriol. 172: 1663-1666). For the transfer, preferably vectors with low numbers of copies are used. As host cells, preferably such amino acid producers are used which are deregulated in the synthesis of the respective amino acids and/or which have an increased availability of central metabo-

lism metabolites.

After isolation, export genes with nucleotide sequences can be obtained which code for the amino acid sequences given in table 3 or for their allele variations or, respectively, which include the nucleotide sequence of 1016 to 1725 according to table 2 or a DNA sequence which is effective essentially in the same way. Also here, allele variations or equally effective DNA sequences include particularly functional derivatives in the sense indicated above for the regulatory sequences. These export genes are preferably used in the process according to the invention.

One or several DNA sequences can be connected to the export gene with or without attached promoter or respectively, with or without associated regulator gene, so that the gene is included in a gene structure.

By cloning of export genes, plasmids or, respectively, vectors can be obtained which contain the export gene and which, as already mentioned, are suitable for the transformation of an amino acid producer. The cells obtained by transformation which are mainly transformed cells from *Corynebacterium*, contain the gene in reproducible form, that is, with additional copies on the chromosome wherein the gene copies are integrated at any point of the genome by homologous recombination and/or on a plasmid or respectively, vector.

A multitude of sequences is known which code for membrane proteins of unknown function. By providing in accordance with the invention export genes such as the export gene with the nucleotide sequence of nucleotide 1016 to 1725 in accordance with table 2 or respectively, the corresponding export proteins for example that with the amino acid sequence according to table 1, it is now possible to identify, by sequence comparison, membrane proteins, whose function is the transport of amino acids.

The export gene identified in this way can subsequently be used to improve the amino acid production in accordance with the process of the invention.

The membrane proteins known from the state-of-the-art generally include 12, some also only 4 transmembrane helices. However, it has now been found surprisingly that the membrane proteins responsible or suitable for the export of amino acids include 6 transmembrane helices (see for example, the amino acid sequence of an export protein listed in the table 3, wherein the 6 transmembrane areas have been highlighted by underlining). Consequently, there is a new class of membrane proteins present, which has not yet been described.

Examples:

a) Cloning of an export gene and cloning of a regulator of *Corynebacterium glutamicum*.

Chromosomal DNA from *C. glutamicum* R127 (FEMS Microbiol Lett. (1989) 65: 299-304) was isolated as described by Scharzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87). The DNA was then split with the restriction enzyme *Sau3A* and separated by saccharose gradient centrifugation as described in Sambrook et al. (Molecular cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). The various fractions were analyzed gel-electrophoretically with respect to their size and the fraction with a fragment size of about 6 - 10 kb was used for the ligation with the vector pJCl. In addition, the vector pJCl was linearized with *Bam*HI and dephosphorylized. Five ng thereof was ligated with 20 ng of the chromosomal 6-10 kb fragments. With the whole ligation preparation, the export defective mutant NA8 (J. Bacteriol. (1995) 177: 4021-4027) was transformed by electroporation (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304). The transformants were selected for LBHIS (PEMS Microbiol. Lett. (1989) 65: 299-304) with 15 µg kanamycin per ml.

These transformants were subjected to extensive plasmid analyses in that 200 of the altogether 4500 clones obtained were individually cultivated and their plasmid content and size was determined. On average, about half of the kanamycin-resistant clones carried a recombinant plasmid with an insert of the average size of 8 kb. This provides for a probability of 0.96 for the presence of any gene of *C. glutamicum* in the established gene bank. The 4500 obtained transformants were all individually checked for renewed presence of lysine secretion. For this purpose, the system described by Vrljic for the induction of the L-lysine excretion in *Corynebacterium glutamicum* was utilized (J. Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). For this purpose, so-called minimal-medium-indicator plates were prepared, which contained per liter 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g uric acid, 1 g KH_2PO_4 , 1 g K_2HPO_4 , 0.25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 42 g morpholino propane sulfonic acid, 1 ml CaCl_2 (1 g/100 ml), 750 ml dest., 1 ml Cg trace salts, 1 ml biotin (20 mg/100 ml), pH7, 4 % glucose, 1.8 mg protocatechuic acid, 1 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.1 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0.02 mg CuSO_4 , 0.002 mg $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 20 g agar-agar, as well as 10^7 cells/ml of the lysine-auxotrophene *C. glutamicum* mutant 49/3. The original 4500 transformants were all individually pinned, by toothpicks onto the indicator plates with, in each case, a check of the original non-excretor NA8 (J.Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) and the original strain R127. At the same time, always 2 plates were inoculated of which only one contained additionally 5 mM L-methionine in order to induce the lysine excretion in this way. The indicator plates were incubated at 30°C and examined after 15, 24 and 48 hours. In this way, altogether 29 clones were obtained which showed on the indicator plate provided with methionine a growth court by the indicator strain 49/3. The clones were examined individually and then again as described

above, for reestablishment of the growth court. In this way, the two clones NA8 pMV8-5-24 and NA8 pMV6-3 were obtained which had again received the capability to excrete lysine.

From these clones, plasmid preparations were performed as described in Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9; 84-87). By retransformation in NA8, the plasmid-connected effect of the excretion of L-lysine was confirmed. Both plasmids were subjected to a restriction analysis. Plasmid pMV8-5-24 carries an insert of 8.3 kb, and pMV6-3 one of 9.5 kb. The physical character of the inserts is shown in Fig. 1.

b) Subcloning of an DNA fragment which reconstitutes the lysine export.

From the insert of the plasmid pMV6-3 individual subclones were prepared utilizing the restriction severing point as determined. In this way, the 3.7 kb XhoI-SalI-fragment, the 2.3 kb BamHI-fragment and the 7.2 kb BamHI fragment were ligated with the correspondingly severed and treated vector pJC1 (Mol Gen. Genet. (1990) 220: 478-480). With the ligation products *C. glutamicum* NA8 was directly transformed, the transformants were tested for having the lysine excretion properties and the presence of the subclone was confirmed by plasmid preparation and restriction analysis. In this way, the strain with plasmid pMV2-3 (Fig. 1) was obtained as smallest subclone. This fragment resulting in lysine export contains as insert the 2.3 kb BamHI-fragment from pMV6-3.

c) Sequence of the lysine export gene *lys E* and its regulators *lysG*.

The nucleotide sequence of the 2.3 kb BamHI fragment was performed according to the dideoxy-chain termination method of Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci USA (1977) 74: 5463-5467) and the sequencing reaction with the AutoRead Sequencing kit from Pharmacia (Uppsala, Sweden). The electrophoretic analysis

occurred with the automatic laser-fluorescence DNA sequencing apparatus (A.L.F) from Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, USA). The nucleotide sequence obtained was analyzed by the program packet HUSAR (Release 3.0) of the German Cancer Research Center (Heidelberg). The nucleotide sequence and the result of the analysis is presented in table 2. The analysis results in two fully open reading frames (ORF) on the sequenced DNA piece. ORF1 codes for a protein with a length of 236 amino acids, ORF2 for a protein with a length of 290 amino acids. The protein derived from ORF1 includes an accumulation of hydrophobic amino acids as they are characteristic for membrane-embedded proteins. The detailed analysis of the distribution of the hydrophobic and hydrophilic amino acids by the programs PHD.HTM (Protein Science(1995)4: 521-533) is shown in table 3. It is apparent therefrom that the protein contains six hydrophobic helix areas, which extend through the membrane. Consequently, this protein is the searched for exporter of the amino acid L-lysine. The corresponding gene will therefore be designated below as lysE. In table 2, it is marked accordingly. ORF2 is transcribed in a direction opposite to ORF1. The sequence analysis shows that ORF2 has a high identity with regulator genes, which are combined as a single family (Ann Rev Microbiol (1993) 597-626). Genes of this family regulate the expression processes of the various genes involved in catabolic or anabolic processes in a positive way. For this reason, ORF2 will below be designated as lysG (Govern=regulating). Because of the coordination and because lysE could be cloned (see a)) and subcloned (see b)) together with lysG, lysG is regulator of lysE and consequently also participates in the lysine export. The gene lysG and the amino acid sequence derived therefrom are also shown in table 2 and, respectively, table 1.

d) Identification of an unknown membrane protein from Es-

cherichia coli by sequence comparison.

With the established sequences according to table 3 already existing sequence banks can be searched in order to assign the proteins derived in this way from sequenced areas a certain function. Correspondingly, the amino acid sequence of the lysine exporters consisting of *C. glutamicum* were compared with derivated protein sequences of all the DNA sequences deposited there utilizing the program packet HUSAR (Release 3.0) of the German Cancer Research Center (Heidelberg). A high homology of 39.3% identical amino acids and 64.9% similar amino acids was found to a single sequence of so far unknown function of *E.coli*.

The comparison is shown in Fig. 2. As a result, the open read frame of *E. coli* so far not characterized is identified by way of this process as an amino export gene.

e) Increased export of intracellularly accumulated L-lysines.

The strain *C. glutamicum* NA8 (*J. Bacteriol* (1995) 177: 4021-4027) was transformed with plasmid pMV2-3 and the L-lysine excretion of the strains was compared. For this purpose, NA8 and NA8pMV2-3 in complex medium were utilized as described in Vrljic et al. (*J. Bacteriol* (1995) 177: 4021-4027) and the fermentation medium CGXII (*Bacteriol* (1993) 175: 5595-5603) were each separately inoculated. The medium additionally contained 5mM L-methionin in order to induce the intracellular L-lysine biosynthesis. After cultivation for 24 hours at 30°C on a rotary vibrator at 140 rpm, the cell internal and external L-lysine determinations were performed. For the cell-internal determination silicon oil centrifugations were performed (*Methods Enzymology* LV (1979) 547-567); the determination of the amino acids occurred by high pressure liquid chromatography (*J. Chromat* (1983) 266: 471-482). These determinations were per-

formed at different times as indicated in Fig. 3. In accordance with the process used the retained cell internal L-lysine is excreted also by pMV2-3 to a greater degree and is accumulated.

Accordingly, also the cell-internally present L-lysine is greatly reduced. Consequently, the utilization of the newly discovered and described exporter represents a process for greatly improving the L-lysine production.

f) Increased accumulation of L-lysine by lysE or LysEG.

From the subclone pMV2-3, which contains the sequenced 2374 bp BamHI-fragment in pJCI (see figure 1), the lysE carrying 1173 bp PvuII-HindII fragment was ligated in pZ1 (Appl. Env. Microbiol (1989)55: 684-688) according to the sequence information and in this way, the plasmid plysE was obtained. This plasmid as well as the lysElysG carrying plasmid pMV2-3 was introduced into *C. glutamicum* strain d by electroporation by deletion of the chromosomal areas. The obtained strains *C. glutamicum* d pMV2-3, *C. glutamicum* d plysE, *C. glutamicum* pJCI were, as described under e) first precultivated on a complex medium, then cultivated in production minimal medium CGX11 together with 4% glucose and 5 mM l-methionin and samples were taken to determine the accumulated L-lysine. As apparent from Fig. 4, with lysElysG an increase of the lysine accumulation with respect to a control sample is achieved. With plysE an extraordinarily increased accumulation of from 4.8 to 13.2 mM L-lysine is achieved with this method.

LEGENDS OF THE TABLES AND FIGURES

Table 1: The amino acid sequence of the lysine exporter regulator from *Corynebacterium glutamicum* with the helix-turn-helix motive typical for DNA-binding proteins.

Table 2(three pages): The nucleotide sequence of *C. glutamicum* coding for the lysine exporter and lysine export regulators.

Table 3: the amino acid sequence of the lysine exporter from *Corynebacterium glutamicum* with the identified transmembrane helices TMH1 to TMH6.

Figure 1: the fragments in pMV6-3 and pMV8-5-24 obtained by the cloning which cause the lysine secretion and the subclone pMV2-3 made from pMV6-3, which also causes the lysine secretion and which was sequenced. B, BamHI; Sm, SmaI; Sc, SacI; S1, SalI; H, HindIII; X, XhoI.

Figure 2: Comparison of the derivated amino acid sequence of LysE from *C. glutamicum* (above), with a gene product of so far unknown function from *Escherichia coli* (below), which is identified thereby as export carrier.

Fig. 3: Increased lysine export by pMV2-3 with *C. glutamicum* NA8. At the top, the control with low excretion and cell-internal backup of lysine up to about 150 mM. Below, the high secretion caused by pMV2-3 with cell internally only small backup of about 30 mM.

Figure 4: the increase of the lysine accumulation in *C. glutamicum* by lysElys G (pMV2-3) (middle curve), and the accumulation caused by lysE(plysE) (upper curve).

Table 1

1 MNPIQLDTLL SIIDEGSFEG ASLALSISPS AVSQRVKALE
HHVGRVLSR

Helix-Turn-Helix-Motiv

51 TQPAKATEAG EVLVQAARKM VLLQAETKAQ LSGRLAEIPL
TIAINADSL

101 TWFPVFNEV ASWGGATLTL RLEDEAHTLS LLRRGDVLGA
VTREANPVAG

151 CEVVELGTMR HLAIATPSLR DAYMVDGKLD WAAMPVLRFG
PKDVLQDRDL

201 DGRVDGPVGR RRVSIVPSAE GFGEAIRRGL GWGLLPETQA
APMLKAGEVI

251 LLDEIPIDTP MYWQRWRLES RSLARLTDV VDAAIEGLRP

Table 2

GGTAACGACTTCCACAATGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCGCTTCTTCACTTTTTG 60
 GGACTTGGAAAAGTCTTCAATTGATTCCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG 120
 - P R L G E I A A D V V A
 CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGGTCCGCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA 180
 D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T
 CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCCTAGTGAAGAGGACGAAATCGTACCCTCGTCGAAC 240
 D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q
 CCAAAGCCCTTCTTCAGGGGTTGGTTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTGGGAAGCGG 300
 T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A
 GCTGCCCTGTTACCTATGCGCGGACGCGGGGTGCTCCTGGTAGCTGCGCGGGCAGGTCCAG 360
 S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D
 TGCCAGAACTTCGTGTAGAAACCCTGGCTTCGCATTCTGCCCGTAGCGTCGGGTTAGATC 420
 R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L
 AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCGCGTA 480
 K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M
 CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAATCGAAGTGCCCAATGGCGAGG 540
 T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G
 ATTTTGTAGAGGTGCGGCGTCGTTCTTATTACACGCGAAGTAGAAGGTTCCGCGTCGCA 600
 L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T
 CTCGCAACGAGGTGGGGTTCTTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTGGTACACCTATC 660
 L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L
 GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCAGGTCTATCAACGCG 720
 S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A
 AAATCAAAGACGAACGTCGTTGTGGTAAAAGGCGGACGAACGTGTTCTGAAGTGGGCG 780
 K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A
 AAGCCAACGAAACCGGCCAACCCACGCGCTATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC 840
 E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L
 TCGAAATTGCGCGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTTACCTTTCCGATTCTCCGCGGAAG 900
 A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E

Table 2 (cont.)

RCGS 960
 <---LysG
 CTTCGACGGAAGTAGTTACTAAGTCTCGTTTCACAGGTCAACTTACCCCAAGTA-----5
 5'---TGCTTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCAGTTGAATGGGGTTCATGAAGCT
 F S G E D I I S L L T D L Q I P N M
 RBS 1020
 ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTTTACTTAAGTACTTCCATAGGTCACGATGGT
 M V
 LysE--->
 GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCGCTTTTGGGGGCCAGTCTTTTACTGTCCATCGG 1080
 I M E I F I T G L L L G A S L L L S I G
 ACCGAGAAATGTACTGGTGATTAACAAGGAATTAAGCGCGAAGGACTCATTGCGGTTCT 1140
 P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L
 TCTCGTGTGTTTAATTTCTGACGTCTTTTTGTTTCATCGCCGGCACCTTGGGCGTTGATCT 1200
 L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L
 TTTGTCCAATGCCGCGCGGATCGTGCTCGATATTATGCGCTGGGGTGGCATCGCTTACCT 1260
 L S N A A P I V L D I M R W G G I A Y L
 GTTATGGTTTGGCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAAGGTGGAAGCGCCACA 1320
 L W F A V M A A K D A M T N K V E A P Q
 GATCATTGAAGAAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCCTTTGGGCGGTTTCGGCGGT 1380
 I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V
 >>>>>> > < <<<<<<<
 GGCCACTGACACGCGCAACCGGGTGCGGGTGAGGTGAGCGTCGATAAGCAGCGGGTTTG 1440
 A T D T R N R V R V E V S V D K Q R V W
 GCTAAAGCCCATGTTGATGGCAATCGTGCTGACCTGGTTGAACCGAATGCGTATTTGGA 1500
 V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D
 CCGGTTTGTGTTTATCGGCGGCGTCGGCGCGCAATACGGCGACACCGGACGGTGGATTTT 1560
 A F V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F
 CGCCGCTGGCGGTTTCGGCGCAAGCCTGATCTGGTTCCCGCTGGTGGGTTTCGGCGCAGC 1620
 A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A
 AGCATTGTACGCCCCGCTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGCTGGATCAACGTCGTCGTGGC 1680
 A L S R P L S S P K V W R W I N V V V A

Table 2 (cont.)

>>>>>> <<<<<<< /-orf3
 - N E R T K
 5' C T A C T G G C G T A A C C G G T A G T T T G A C T A C A A C T A C C C A A T C A A A A G C G C C C A A A A
 A G T T G T G A T G A C C G C A T T G G C C A T C A A A C T G A T G T T G A T G G G T A G T T T T C G C G G G 5'
 V V M T A L A I K L M L M G -
 LysE / >>>>

C C T T A G C C A C C G G A A G C G G T T T A C A A C T A C G G C C G C A G C A C C C T T T A G A G T A G C T A G C G
 S D T A K A W I N I G A D H S I E D I A
 <<<<<

G A G G T T G A G C C G C A G T C T T T T G A G G T T C A A C A A C T C A C T T A G T T C G A C A A C A G G T C G A C
 E L E A D S F E L N N L S D L S N D L Q

G A G T T G A C T G C T T C G T G G T T A G T T A C G T G A C C A G T G C C A T A G C G C G G C A T G A G A G A A C
 E V S S A G I L A S T V T D A G Y E G Q

G A G C G C G T C G T G G G T A C G T T C G C G G T A G A C G C G T T C A C T G A C G G G C G C A A G G A C C C G C T A
 E R L V W A L A M Q A L S Q G R E Q A I

C A G T A A C T C G A A C G C C T G G T A T A G T T A T A A C A A G T G C A A G T T G T A C G G G A G T C T G T C C C T
 D N L K R V M D I N N V N L M G E S L S

G A A T G G G A C C G A C C G C G C C C T T G G G A G A C C T T A A G G T A G C T C T A T A A A C A G G C A C T C G T C
 K G Q S A R S G E P I G D L Y K D T L L

C G G A C G C G T T C A C C A C T C T T T C G T T A C T G C G G T T C T G G T A A C A A C C G T C G A C T G A C G T T
 G Q A L P S F A I V G L G N N A A S Q L

G T T C A A G A G T G G C A G T A C G G G C C A A G G A G G T G G G T T G C T A A T T A C T A C C T T A T C G A A C C
 L N E G D D G P E E V W R N I I S Y S P

G A C T A C T T A G T C T T C G C C C G T C G G G A G G A G G C G G T A C T T G A G T C G G C G G A G G C G A C A C T C
 Q H I L L P C G E E A M F E A A E A T L

G A G A C C T G C A T C C T T C T T T A T G G G T G C A T T T C T C G A A A G G T C T G C G T T G T T A C A G T G C
 E P G Y S S I G V Y L A K G S A V I D R

G T T A C G C A T G T A C C A A G A A G G T T T C T C A T A G A
 L A Y M T E E L P T D

<-orf3/

Table 3

1	<u>MVIMEIFITG</u>	<u>LLLGASLLLS</u>	<u>IGPQNVLVIK</u>	<u>QGIKREGLIA</u>
	<u>VLLVCLISDV</u>			
		TMH1		TMH2
51	<u>FLFIAGTLGV</u>	<u>DLLSNAAPIV</u>	<u>LDIMRWGGIA</u>	<u>YLLWFAVMAA</u>
	<u>KDAMTNKVEA</u>			
				TMH3
101	<u>PQIIETEPT</u>	<u>VPDDTPLGGS</u>	<u>AVATDTRNRV</u>	<u>RVEVSVDKQR</u>
	<u>VWVKPMLMAI</u>			
151	<u>VLTWLNPAY</u>	<u>LDAFVFIGGV</u>	<u>GAQYGDTGRW</u>	<u>IFAAGAF AAS</u>
	<u>LIWFPLVGFG</u>			
		TMH4		TMH5
201	<u>AAALSRPLSS</u>	<u>PKVWRWINVV</u>	<u>VAVVMTALAI</u>	<u>KLMLNG</u>
				TMH6

PATENT CLAIMS

1. Process for the microbacterial production of amino acids, wherein the export carrier activity and/or the export gene-expression of a microorganism producing the respective amino acid is increased.

2. Process according to claim 1, characterized in that the endogenous export carrier activity of the microorganism is increased.

3. Process according to claim 2, characterized in that by mutation of the endogenous export gene a carrier with higher export activity is generated.

4. Process according to one of the claims 1 to 3, characterized in that the gene expression of the export carrier is increased by increasing the number of gene copies.

5. Process according to claim 4, characterized in that to increase the number of copies the export gene is installed in a gene construct.

6. Process according to claim 5, characterized in that the export gene is installed in a vector with a low number of copies.

7. Process according to claim 5 or 6, characterized in that the export gene is installed in a gene construct, which includes regulatory gene sequences assigned to the export gene.

8. Process according to claim 7, characterized in that the regulatory gene sequence includes a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence given in table 1 and the nucleotide sequence coding for the allele variations thereof.

9. Process according to claim 9, characterized in that the regulatory gene sequence includes a nucleotide sequence of nucleotide 954 to 82 according to table 2 or a DNA sequence effective essentially in the same way.

10. Process according to one of the claims 5 to 9, characterized in that a microorganism producing the respective amino acid is transformed with the gene construct including the export gene.

11. Process according to claim 10, characterized in that a microorganism of the type *Corynebacterium* is transformed with the gene construct including the export gene.

12. Process according to claim 10 or 11, characterized in that for the transformation a microorganism is utilized in which the enzymes, which participate in the synthesis of the corresponding amino acids, are deregulated.

13. Process according to one of the claims 10 to 12, characterized in that for the transformation a microorganism is utilized which contains an increased part of the central metabolism metabolites.

14. Process according to one of claims 4 to 13, characterized in that the export gene is isolated from a microorganism strain of the type *Corynebacterium*.

15. Process according to one of the preceding claims, characterized in that the export gene sequence is identified by comparison with the sequence of an already known export gene.

16. Process according to claim 15, characterized in that the amino acid sequence derived from the export gene sequence to be identified is compared with the amino acid sequence given in table 3 or the allele variation thereof.

17. Process according to one of the preceding claims, characterized in that the export gene expression is increased by amplifying the transcription signals.

18. Process according to one of the preceding claims, characterized in that as export gene, a gene with a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence given in table 3 and the allele variations thereof is utilized.

19. Process according to claim 18, characterized in that as export gene a gene with the nucleotide sequence of nucleotide 1016 to 1725 according to table 2 or a DNA sequence with essentially the same effects is utilized.

20. Process according to one of the preceding claims for the manufacture of L-lysine.

21. Export gene coding for an amino acid export carrier.

22. Export gene according to claim 21 with a nucleotide sequence coding for an amino sequence given in table 3 or the allele variation thereof.

23. Export gene according to claim 22 with the nucleotide sequence of nucleotide 1016 to 1725 according to table 2 or a DNA sequence with essentially the same effects.

24. Export gene according to one of the claims 21 to 23 with regulatory gene sequences assigned thereto.

25. Export gene according to claim 24, characterized in that the regulating gene sequence includes a nucleotide sequence coding for the amino sequence given in table 1 and the allele variations thereof.

26. Export gene according to claim 25, characterized in that the regulating gene sequence includes a nucleotide sequence of nucleotide 954 to 82 according to table 2 or a DNA sequence effective essentially in the same way.

27. Regulator gene suitable for the regulation of an export gene coding for an amino acid and export carrier, including a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence given in table 1 and the allele variations thereof.

28. Regulator gene according to claim 27 with the nucleotide sequence of nucleotide 954 to 82 according to table 2 or a DNA sequence effective essentially in the same way.

29. Gene structure containing an export gene according to one of claims 21 to 26.

30. Gene structure including a regulatory gene sequence according to claim 27 or 28.

31. Vector including an export gene according to one of claims 21 to 26 or a gene structure according to claim 29.

32. Vector according to claim 31 with a low number of copies.

33. Vector including a regulatory gene sequence according to claim 27 or 28 or a gene structure according to claim 30.

34. Transformed cell including, in a replicable form, an export gene according to one of the claims 21 to 26 or a gene structure according to claim 29.

35. Transformed cell according to claim 34 including a vector according to claim 31 or 32.

36. Transformed cell according to claim 34 or 35, characterized in that it belongs to the type *Corynebacterium*.

37. Transformed cell according to one of claims 34 to 36, characterized in that in this cell the enzymes of the amino acid, which participate in the synthesis, are deregulated and wherein the amino acid is removed from the cell by way of the export carrier for which the export gene, which was transferred into the transformed cell, codes.

38. Transformed cell according to one of claims 34 to 37, characterized in that the cell includes an increased proportion of central metabolism metabolites.

39. Transformed cell including, in replicable form, a regulatory gene sequence according to claim 27 or 28 or a gene structure according to claim 30.

40. Transformed cell according to claim 39, including a vector according to claim 33.

41. Membrane protein with 6 transmembrane helices suitable for the export of amino acids.

42. Membrane protein according to claim 41, including the amino acid sequence given in table 3 wherein table 3 is part of this claim.

43. Use of an export gene for increasing the amino acid production of microorganisms.

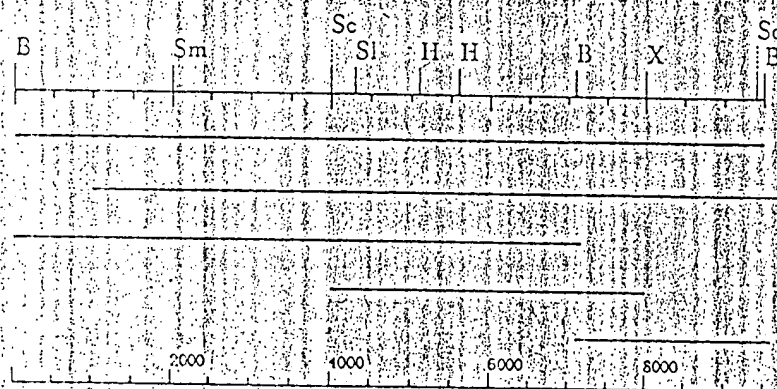
44. Use according to claim 43, characterized in that a mutated export gene, which codes for an enzyme with increased export carrier activity, is utilized.

45. Use according to claim 43 or 44, characterized in that the amino acid producing microorganism is transformed with a gene construct, which includes an export gene.

46. Use according to claim 45, characterized in that the gene construct additionally carries regulatory gene sequences.

47. Use according to one of the claims 43 to 46, characterized in that an export gene from Corynebacterium is utilized.

48. Use according to one of claims 43 to 47, characterized in that Corynebacterium is used as amino acid producing micro-organism.



Lysin^c secretion

pMV6-3	+
pMV8-5-24	+
pMV7-2	-
pMV3-7	-
pMV2-3	+

Figure 1

CgLyse 1 MVIMEIFITGLLLGASLLLSIGPONVLVIKOGIKREGLIAVLLVCLISDV 50
 EcYgga 1MILPLGPQNAFVMNOGIRROYHIMIALLCASDL 34

 CgLyse 51 FLFIAGTIGVDLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWFAVMAAKDAMTNKVEA 100
 EcYgga 35 VLICAGIFGGSALLMQSPWLLALVTWGGVAFLLWYGFGAFKTAMSSNIE 83

 CgLyse 101 PQIIETEPTVPDDTPLGGSATDTRNRVRVEVSVDKORVWVKPMLMAI 150
 EcYgga 84LASAEVMKQGRWK.....IIATMLAV 104

 CgLyse 151 VTWLNPNAYLDAFVFIGGVGAQYGDTRWIFAGAFRAASLIWFPLVGGF 200
 EcYgga 105 ..TWLNPHVYLDTFVVLGSLGGQLDVEPKRWFFALGTISASFLWFFGLALL 152

 CgLyse 201 AAALSRLSSPKVWRWINVVAVVMTALAIKMLMG..... 236
 EcYgga 153 AAWLAPRLRTAKAQRIINLVVGCVMWFIALQLARDGIAHAQALFS 197

Figure 2

CgLyse 1 MVIMEIFITGLLLGASLLLSIGPQNVLVIKOGIKREGLIAVLLVCLISDV 50
 EcYgga 1MILPLGPQNAFVMNOGIRROYHIMIALLCASDL 34

 CgLyse 51 FLFIAGTLGVDLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWFAVMAAKDAMTNKVEA 100
 EcYgga 35 VLICAGIFGGSALLMQSPWLLALVTWGGVAFLLWYGFAGFTAMSSNIE 83

 CgLyse 101 PQIIETEPTVPDDTPLGGSATDTRNRVRVEVSVDKORVWVKPMLMAI 150
 EcYgga 84LASAEVMKQGRWK.....IIATMLAV 104

 CgLyse 151 VTWLNPNAYLDAFVFIGGVGAQYGDTRWYFAACAFASLIWFPLVGGF 200
 EcYgga 105 ..TWLNPHVYLDTFVVLGSLGGQLDVEPKRWFFALGTISASFLWFFGLALL 152

 CgLyse 201 AAALSRLSSPKVWRWINVVAVVMTALAIKMLMG..... 236
 EcYgga 153 AAWLAPRLRTAKAQRIINLVVGCVMWFIALQLARDGIAHAQALFS 197

Figure 2

Complementation of Export defects

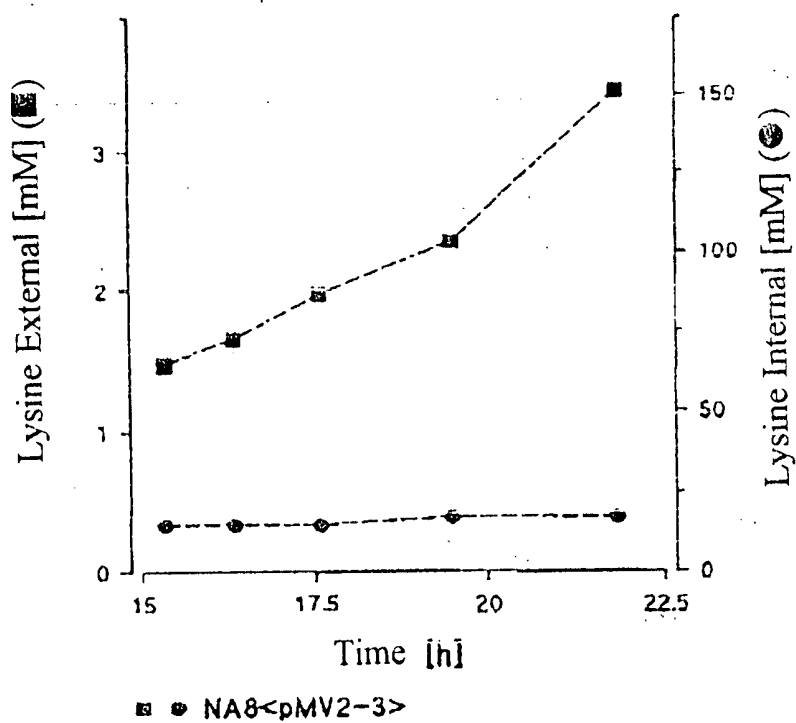
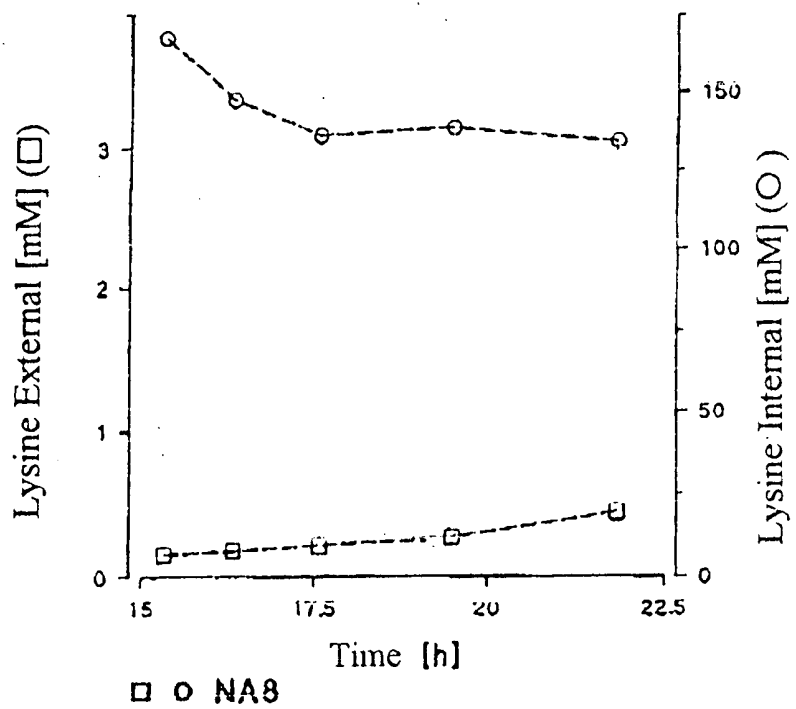


Figure 3

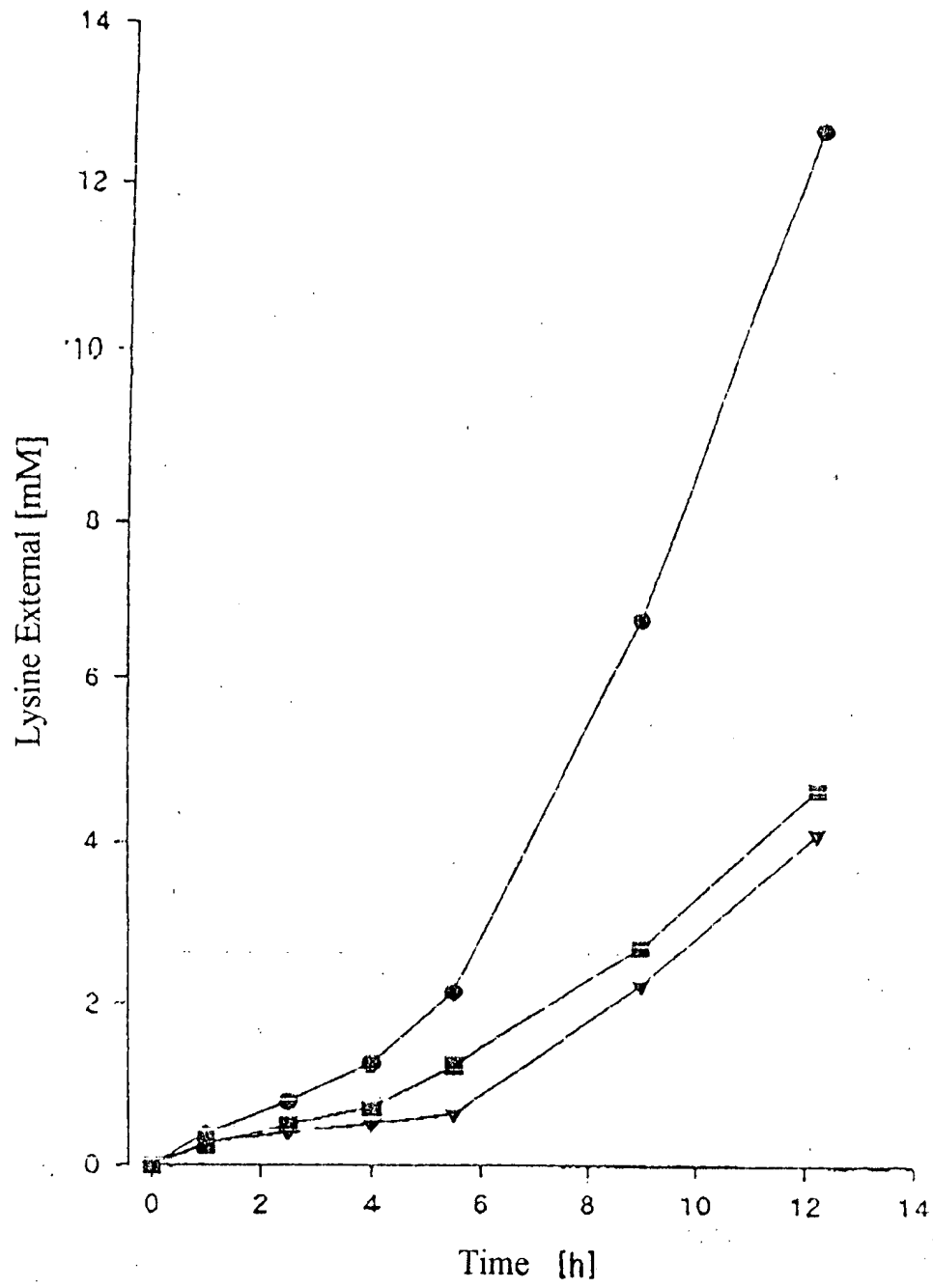


Figure 4

438



RECEIVED

FEB 28 2002

TECH CENTER 1600/2900

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

RECEIVED

FEB 28 2002

TECH CENTER 1600/2900

Aktenzeichen:

195 48 222.0

Anmeldetag:

22. Dezember 1995

Anmelder/Inhaber:

Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren durch gesteigerte Aktivität von Export-carriern

IPC:

C 12 N, C 12 P, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Dezember 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert



Forschungszentrum Jülich GmbH

B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren durch gesteigerte Aktivität von Exportcarriern

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren gemäß den Ansprüchen 1 bis 20, Exportgene nach Anspruch 21 bis 26, Regulatorgene nach Anspruch 27 und 28, Genstrukturen gemäß den Ansprüchen 29 und 30, Vektoren nach Anspruch 31 bis 33, transformierte Zellen nach Anspruch 34 bis 40, Membranproteine gemäß Anspruch 41 und 42 sowie Verwendungen nach Anspruch 43 bis 48.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z.B. L-Lysin, wie auch L-Threonin, und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament, oder L-Glutamat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B.

Corynebacterium glutamicum und seine Verwandten ssp. *flavum* und ssp. *lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol (1991) 41:255-260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschaltung der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloge eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist ein Verfahren beschrieben, bei dem *Corynebacterium*-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Threoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849 B1, UK Patent Application GB 2 152 509 A).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 124375/1986, EP 0 488 424). Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese codieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die

Lysinbildung durch erhöhte Synthese der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Threoninbildung erreicht (EP 0 436 886 A1).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin, oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463 A2). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvatcarboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 331 145).

Diese vielfältigen Versuche zur Produktivitätssteigerung sind insgesamt darauf gerichtet, die Limitation der cytosolischen Synthese der Aminosäuren zu überwinden. Als eine weitere Limitation kommt grundsätzlich aber auch der Export der im Zellinneren gebildeten Aminosäuren ins Kulturmedium in Betracht. Daher gibt es vereinzelte Ansätze, diesen Export und damit die Wirtschaftlichkeit der Aminosäureproduktion zu verbessern. So hat man die Zellpermeabilität bei *Corynebacterium* durch Biotinmangel, Detergenz- oder Penicillinbehandlung erhöht. Diese Ausschleusehilfen waren jedoch ausschließlich bei der Glutamatproduktion erfolgreich, während die Synthese anderer Aminosäuren auf diese Weise nicht verbessert werden konnte. Auch sind Bakterienstämme entwickelt worden, bei denen die Aktivität des Sekretionssystems aufgrund chemischer oder physikalischer Mutation erhöht ist. Es wurde dadurch beispielsweise ein *Corynebacterium glutamicum*-Stamm erhalten, der sich durch eine verbesserte Sekretionsaktivität insbesondere für die L-Lysinproduktion eignet (DE 42 03 320).

Insgesamt zeichnen sich alle bisher durchgeführten Versuche zur Erhöhung der Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren dadurch aus, daß ein erhöhter Efflux von Aminosäuren aufgrund der gewählten ungerichteten bzw. unspezifischen Methoden nur durch Zufall erreicht werden konnte. Einzig in der Deutschen Patentanmeldung No. 195 23 279.8-41 ist ein Verfahren beschrieben, das es erlaubt, die Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren ganz gezielt zu erhöhen, indem die Expression von für den Import von Aminosäuren kodierenden Genen erhöht wurde. Die dieser Vorgehensweise zugrundeliegende Erkenntnis, daß die Zelle Importproteine für den Export von Aminosäuren verwendet wie auch die Tatsache, daß Mikroorganismen von Natur aus keine überschüssigen Aminosäuren bilden und ausscheiden, legt die Vermutung nahe, daß für den Aminosäuretransport spezifische Exportgene bzw. -proteine gar nicht existieren, sondern daß aus der Zelle die Aminosäuren über andere Exportsysteme exkretiert werden.

Die bisher bekannten Exportsysteme exportieren giftige Metallionen, toxische Antibiotika und höhermolekulare Toxine. Diese Exportsysteme sind relativ komplex aufgebaut: In der Regel sind Membranproteine der Cytoplasmamembran beteiligt, die jedoch nur eine Teilreaktion des Exports bewirken, so daß vermutlich für den Transport zusätzliche, extracytoplasmatische Hilfsproteine erforderlich sind (Dinh, T. et al., A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1994, 176: 3825-3831). Desweiteren ist bekannt, daß bei dem *sec*-abhängigen Exportsystem für extrazelluläre Proteine mindestens 6 verschiedene Proteinkomponenten für den Export essentiell sind. Dieser Stand der Technik legt die Vermutung nahe, daß ebenso die für den Export von Aminosäuren zuständigen, aber bislang unbekannten Systeme aus mehreren Proteinkomponenten bestehen bzw. mehrere Gene für den Export von Aminosäuren zuständig sind. Hinweis dafür könnten die von Vrljic

et al. beschriebenen (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) X ✓
verschiedenen, im Lysinexport defekten Mutanten sein.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgen-Expression und/oder die Exportcarrier-Aktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Sekretionsrate, so daß der Export der entsprechenden Aminosäure erhöht ist. Auch akkumulieren derart veränderte Mikroorganismen einen erhöhten Anteil der entsprechenden Aminosäure im Kulturmedium.

Zur Erhöhung der Exportcarrier-Aktivität wird insbesondere die endogene Aktivität eines Aminosäure-produzierenden Mikroorganismus erhöht. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikationen oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene Exportcarrier-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des endogenen Exportgens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

Die Exportgen-Expression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Exportgen-Expression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder, indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Exportgen zugeordneten Regulatorgens erfolgen, wie weiter unten ausgeführt wird. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Exportgen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, vorzugsweise in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Die regulatorischen Gensequenzen weisen insbesondere eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz bzw. eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz auf. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei aber die Regulatorprotein-Aktivität bzw. -Funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist: So kann durch Mutation der regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung des Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Exportgens so beeinflussen sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression

erhöht ist. Desweiteren können dem Exportgen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Exportgen-Expression bewirken.

Für den Einbau des Exportgens in ein Genkonstrukt wird das Exportgen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert, und mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium*, transformiert. Die Isolierung und Transformation des entsprechenden Transportgens erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle der Isolierung und Klonierung eines Transportgens aus *Corynebacterium* eignet sich beispielsweise die Methode der homologen Komplementation einer exportdefekten Mutante (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Falls keine direkte Klonierung des Strukturgens möglich ist, kann zunächst auch die Insertion von Vektorsequenzen in das Transportgen erfolgen, um es dann über "plasmid-rescue" in Form inaktiver Fragmente zu isolieren. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* ATCC 13032 oder *C. glutamicum ssp. flavum* ATCC 14067 oder auch *C. glutamicum ssp. lactofermentum* ATCC 13869. Nach Isolierung der Gene und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688; Gene 102 (1991) 93-98), erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al. (1989) FEMS Microbiol Lett 65: 299-304) oder Konjugation (Schäfer et al. (1990) J Bacteriol 172: 1663-1666). Für die Übertragung werden vorzugsweise Vektoren mit niedriger Kopienzahl eingesetzt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäuren dereguliert sind und/oder die einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten.

Nach Isolierung sind Exportgene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweisen. Auch hier umfassen Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen insbesondere funktionelle Derivate im oben für die regulatorischen Sequenzen angegebenen Sinne. Diese Exportgene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

Dem Exportgen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Durch Klonierung von Exportgenen sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das Exportgen enthalten und - wie bereits oben erwähnt - zur Transformation eines Aminosäure-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Es sind eine Vielzahl von Sequenzen bekannt, die für Membranproteine unbekannter Funktion kodieren. Durch die erfindungsgemäße Bereitstellung von Exportgenen, wie beispielsweise des Exportgens mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2, bzw. der entsprechenden Exportproteine, wie z.B. das mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle 1, können nunmehr Membranproteine, deren Funktion der Transport von Aminosäuren ist, durch Sequenzvergleich identifiziert werden. Das damit identifizierte Exportgen kann anschließend zur

Verbesserung der Aminosäureproduktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Membranproteine besitzen in der Regel 12, zum Teil auch 4 transmembrane Helices. Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß die für den Export von Aminosäuren zuständigen bzw. geeigneten Membranproteine 6 transmembrane Helices aufweisen (vgl. z.B. die in Tabelle 3 aufgeführte Aminosäuresequenz eines Exportproteins, bei der die 6 transmembranen Bereiche durch Unterstreichen kenntlich gemacht sind). Damit liegt hier eine bisher noch nicht beschriebene und somit neue Klasse von Membranproteinen vor.

Ausführungsbeispiele

a) Klonierung eines Exportgens und Klonierung eines Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* R127 (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) wurde, wie bei Scharzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* gespalten und durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) beschrieben, aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch auf ihre Größe hin analysiert und die Fraktion mit einer Fragmentgröße von etwa 6-10 kb zur Ligation mit dem Vektor pJC1 eingesetzt. Dazu wurde der Vektor pJC1 mit *Bam*HI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurde mit 20 ng der chromosomalen 6-10 kb Fragmente ligiert. Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde die exportdefekte Mutante NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) durch Elektroporation (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) transformiert. Die Transformanten wurden auf LBHIS (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) mit 15 µg Kanamycin pro ml selektioniert. Diese Transformanten wurden umfangreichen Plasmidanalysen unterzogen, indem 200 der insgesamt 4500 erhaltenen Klone einzeln angezogen, und deren Plasmidanteil, und -größe bestimmt wurden. Im Durchschnitt trug etwa die Hälfte der untersuchten Kanamycin-resistenten Klone ein rekombinantes Plasmid mit einem Insert der durchschnittlichen Größe von 8 kb. Damit ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 0,96 für die Anwesenheit jedes x-beliebigen Gens aus *C. glutamicum* in der errichteten Genbank. Die 4500 erhaltenen Transformanten wurden alle einzeln auf Wiedererhalt der Lysinsekretion geprüft. Dazu wurde das von Vrljic beschriebene System zur Induktion der L-

Lysinausscheidung in *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Dazu wurden sogenannte Minimalmedium-Indikatorplatten hergestellt, die pro Liter 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g Harnstoff, 1 g KH_2PO_4 , 1 g K_2HPO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 42 g Morpholinopropansulfon-säure, 1 ml CaCl_2 (1 g/100 ml), 750 ml dest., 1ml Cg Spuren-salze, 1 ml Biotin (20 mg/100 ml), pH7, 4 % Glukose, 1,8 mg Protokatechusäure, 1 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,02 mg CuSO_4 , 0,002 mg $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 20 g Agar-Agar, sowie 10^7 Zellen/ml der Lysin-auxotrophen *C. glutamicum* Mutante 49/3 enthielten. Die ursprünglichen 4500 Transformanten wurden alle einzeln mittels Zahnstocher auf die Indikatorplatten gepickt, mit jeweils einer Kontrolle des ursprünglichen Nichtausscheiders NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) und des Ausgangsstammes R127. Parallel wurden jeweils 2 Platten beimpft, von denen nur eine zusätzlich 5 mM L-Methionin enthielt, um so die Lysinausscheidung zu induzieren. Die Indikatorplatten wurden bei 30 °C inkubiert, und nach 15, 24 und 48 Stunden untersucht. Insgesamt wurden so 29 Klone erhalten, die auf der mit Methionin versetzten Indikatorplatte einen Wachstumshof durch den Indikationsstamms 49/3 zeigten. Die Klone wurden vereinzelt, und dann erneut, wie oben beschrieben, auf Wiedererhalt des Wachstumshofs geprüft. Auf diese Weise wurden die zwei Klone NA8 pMV8-5-24 und NA8 pMV6-3 erhalten, die die Fähigkeit wiedererhalten hatten, Lysin auszuscheiden.

Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, durchgeführt. Durch Retransformation in NA8 wurde der plasmidgebundene Effekt der Ausscheidung von L-Lysin bestätigt. Beide Plasmide wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Plasmid pMV8-5-24 trägt ein Insert von 8,3 kb, und pMV6-3 eines von 9,5 kb. Die physikalische Kartierung der Inserts zeigt Figur 1.

b) Subklonierung eines DNA-Fragments, das den Lysinexport rekonstituiert

Vom Insert des Plasmids pMV6-3 wurden unter Nutzung der bestimmten Restriktionsschnittstellen einzelne Subklone hergestellt. So wurde das 3,7 kb *XhoI*-*SalI*-Fragment, das 2,3 kb *BamHI*-Fragment und das 7,2 kb *BamHI*-Fragment mit dem entsprechend geschnittenem und behandeltem Vektor pJC1 (Mol Gen Genet (1990) 220: 478-480) ligiert. Mit den Ligationsprodukten wurde direkt *C. glutamicum* NA8 transformiert, die Transformanten wie oben beschrieben auf Wiedererhalt der Lysinausscheidung geprüft und die Anwesenheit des Subklons durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse bestätigt. Auf diese Weise wurde als kleinster Subklon der Stamm mit Plasmid pMV2-3 erhalten (Figur 1). Dieses, den Lysinexport vermittelnde Fragment enthält als Insert das 2,3 kb *BamHI*-Fragment aus pMV6-3.

c) Sequenz des Lysinexportgens *lysE* und dessen Regulators *lysG*

Die Nukleotidsequenz des 2,3 kb *BamHI*-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. durchgeführt (Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74: 5463-5467), und die Sequenzierungsreaktionen mit dem AutoRead Sequencing kit von Pharmacia (Uppsala, Sweden). Die elektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz DNA Sequenziergerät (A.L.F.) von Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, USA). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Nukleotidsequenz und das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Analyse ergibt zwei vollständige offene Leseraster (ORF) auf dem sequenzierten DNA-Stück. ORF1 kodiert für ein Protein mit einer Länge von 236 Aminosäuren, ORF2 für eins mit einer Länge von 290 Aminosäuren. Das von ORF1 abgeleitete Protein zeigt eine Häufung hydrophober

Aminosäuren, wie sie für membranständige Proteine charakteristisch ist. Die detaillierte Analyse der Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren mit dem Programm PHD.HTM (Protein Science (1995) 4: 521-533) ist in Tabelle 3 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß das Protein sechs hydrophobe Helixbereiche enthält, die die Membran durchqueren. Damit handelt es sich bei diesem Protein um den gesuchten Exporter der Aminosäure L-Lysin. Das entsprechende Gen wird deswegen im Folgenden als *lyse* bezeichnet. Es ist entsprechend in Tabelle 2 markiert. ORF2 wird in Gegenrichtung zu ORF1 transkribiert. Die Sequenzanalyse zeigt, daß ORF2 hohe Identität mit Regulatorgenen hat, die als eine Familie zusammengefaßt werden (Ann Rev Microbiol (1993) 597-626). Gene dieser Familie regulieren die Expression der verschiedensten an katabolen oder anabolen Prozessen beteiligter Gene in positiver Weise. Im Folgenden wird ORF2 deswegen als *lysG* (Govern = Regulieren) bezeichnet. Wegen dieser Zuordnung, und weil *lyse* nur zusammen mit *lysG* kloniert (siehe a)) und subkloniert werden konnte (siehe b)), ist *lysG* Regulator von *lyse* und somit ebenfalls am Lysinexport beteiligt. Das Gen *lysG* und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz sind ebenfalls in Tabelle 2 bzw. Tabelle 1 gezeigt.

d) Identifizierung eines unbekannten Membranproteins aus *Escherichia coli* durch Sequenzvergleich

Mit den etablierten Sequenzen gemäß Tabelle 3 können bereits existierende Sequenzbanken durchsucht werden, um so den von sequenzierten Bereichen abgeleiteten Proteinen eine Funktion zuzuordnen. Entsprechend wurde die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *C. glutamicum* unter Zuhilfenahme des Programmpakets HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) mit abgeleiteten Protein-Sequenzen aller dort deponierten DNA-Sequenzen verglichen. Zu einer einzigen Sequenz bisher unbekannter Funktion aus *E. coli* ergab sich eine hohe Homologie von 39,3 % identischen

Aminosäuren, und 64,9 % ähnlichen Aminosäuren. Der Vergleich ist in Figur 2 gezeigt. Das bislang nicht charakterisierte offene Leseraster aus *E. coli* ist über dieses Verfahren damit als ein Aminosäureexportgen identifiziert.

e) Gesteigerter Export intrazellulär akkumulierten L-Lysins

Der Stamm *C. glutamicum* NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) wurde mit Plasmid pMV2-3 transformiert, und die L-Lysinausscheidung der Stämme verglichen. Dazu wurden NA8 und NA8pMV2-3 in Komplexmedium wie bei Vrljic et al. (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) beschrieben angezogen, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) jeweils getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 5 mM L-Methionin, um die intrazelluläre L-Lysinbiosynthese zu induzieren. Nach Kultivierung für 24 Stunden bei 30 °C auf dem Rotationsschüttler bei 140 Upm wurde zellinterne und externe L-Lysinbestimmungen durchgeführt. Zur zellinternen Bestimmung wurden Silikonölzentrifugationen durchgeführt (Methods Enzymology LV (1979) 547-567); die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatografie (J Chromat (1983) 266: 471-482). Diese Bestimmungen wurden zu verschiedenen Zeiten, wie in Figur 3 angegeben, durchgeführt. Entsprechend dem benutzten Verfahren wird das angestaute zellinterne L-Lysin also durch pMV2-3 vermehrt ausgeschieden und akkumuliert.

Entsprechend ist erwartungsgemäß auch das zellintern vorhandene L-Lysins stark reduziert. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Exporters ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

f) Gesteigerte Akkumulation von L-Lysin durch *lyse* oder *lySEG*

Vom Subclon pMV2-3, der das sequenzierte 2374 bp *Bam*HI-Fragment in pJC1 enthält (siehe Figur 1), wurde entsprechend der Sequenzinformation das *lyse* tragende 1173 bp *Pvu*II-*Hind*II

Fragment in pZ1 (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688) ligiert, und so das Plasmid *plySE* erhalten. Dieses Plasmid, sowie das *lysElysG* tragende Plasmid pMV2-3 wurde durch Elektroporation in *C. glutamicum* Stamm d eingeführt, indem chromosomale Bereiche deletiert sind. Die erhaltenen Stämme *C. glutamicum* d pMV2-3, *C. glutamicum* d *plySE*, *C. glutamicum* pJC1 wurden wie unter e) beschrieben zunächst auf Komplexmedium vorgezogen, dann in Produktionsminimalmedium CGXII zusammen mit 4% Glukose und 5 mM L-Methionin kultiviert, und Proben zur Bestimmung des akkumulierten L-Lysins entnommen. Wie aus Figur 4 ersichtlich, wird durch *lysElysG* eine Steigerung der Lysinakkumulation gegenüber der Kontrolle erreicht. Die *plySE* wird durch dieses Verfahren eine außerordentlich gesteigerte Akkumulation von 4,8 auf 13,2 mM L-lysin erreicht.

Legenden der Tabellen und Figuren:

Tabelle 1: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporter-Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*, mit dem für DNA-bindende Proteine typischen Helix-Turn-Helix Motif.

Tabelle 2 (drei Seiten): Die Nukleotidsequenz des für den Lysinexporter und Lysinexport-Regulators codierenden Bereichs aus *C. glutamicum*.

Tabelle 3: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *Corynebacterium glutamicum*, mit den identifizierten transmembranen Helices TMH1 bis TMH6.

Figur 1: Die durch die Klonierung erhaltenen DNA-Fragmente in pMV6-3 und pMV8-5-24, die die Lysinsekretion bewirken, sowie der aus pMV6-3 hergestellte Subklon pMV2-3, der ebenfalls die Lysinsekretion bewirkt und sequenziert wurde. B, BamHI; Sm, SmaI; Sc, SacI; Sl, SalI; H, HindII; X, XhoI.

Figur 2: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von LysE aus *C. glutamicum* (oben), mit einem Genprodukt bislang unbekannter Funktion aus *Escherichia coli* (unten), das dadurch als Exportcarrier identifiziert ist.

Figur 3: Gesteigerter Lysinexport durch pMV2-3 mit *C. glutamicum* NA8. Oben, die Kontrolle mit geringer Ausscheidung und zellinternem Anstau von Lysin bis etwa 150 mM. Unten die durch pMV2-3 bewirkte hohe Ausscheidung mit zellinternem nur geringem Anstau von etwa 30 mM.

Figur 4: Die Steigerung der Lysinakkumulation in *C. glutamicum* durch *lysE*_{lysG} (pMV2-3) (mittlere Kurve), und die durch *lysE* (*plySE*) bedingte Akkumulation (obere Kurve).

Tabelle 1

1 MNPIQLDTLL SIIDEGSFEG ASLALSISPS AVSQRVKALE HHVGRVLVSR

Helix-Turn-Helix-Motiv

51 TOPAKATEAG EVLVQAARKM VLLQAETKAQ LSGRLAEIPL TIAINADSLS

101 TWFPVPFNEV ASWGGATLTL RLEDEAHTLS LLRRGDVLGA VTREANPVAG

151 CEVVELGTMR HLAIAATPSLR DAYMVDGKLD WAAMPVLRFG PKDVLQDRDL

201 DGRVDGPVGR RRVSIIVPSAE GFGEAIRRGL GWGLLPETQA APMLKAGEVI

251 LLDEIPIDTP MYWQRWRLES RSLARLTDAV VDAAIEGLRP

49

GGTAAACGACTTCCACAATGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCCCGCTTCTTCACTTTTGG	60
GGACTTGGAAAAGTCTTTCATTGATTCCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG	120
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="text-align: center; margin-right: 10px;"> <i>/LysG</i> - P R L G E I A A D V V A </div> <div> CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGGTCCGCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T </div> </div>	180
CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCCTAGTGAAGAGGACGAAAATCGTACCCTCGTCCAAC D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q	240
CCAAAGCCCTTCTTCAGGGGTTGGTTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTTGGAAGGCG T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A	300
GCTGCCCTGTACCTATGCGCGGACGCGGGGTGTCCTGGTAGCTGCGCGGGCAGGTCCAG S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D	360
TGCCAGAACTTCGTGTAGAAACCCTGGCTTCGCATTCTGCCCGTAGCGTCGGGTTAGATC R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L	420
AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCGCGTA K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M	480
CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAATCGAAGTGCCCAATGGCGAGG T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G	540
ATTTTGTAGAGGTGCGGCGTCGTTTCTTATTACACACGCGAAGTAGAAGGTTTCGCGTCGCA L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T	600
CTCGCAACGAGGTGGGGTTCTTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTTGGTACACCTATC L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L	660
GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCAGGTCTATCAACGCG S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A	720
AAATCAAAGACGAACGTCGTTGTGGTAAAAGGCGCGACGAACGTGTTCTGAAGTGGGCG K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A	780
AAGCCAACGAAACCGGCCAACCCACGCGCTATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L	840
TCGAAATTGCGCGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTTACCTTTCCCGATTCTTCCGCGGAAG A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E	900

Tabelle 2

CTTCGACGGAAGTAGTTACTAACTCTCGTTTCACAGGTCAACTTACCCCAAGTA-----5
5'---TGCCTTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCCAGTTGAATGGGGTTCATGAAGCT
F S G E D I I S L L T D L Q I P N M

ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTTTACTTAAGTACTTCCATAGGTCACGATGGT
M V
-Lyse->

GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCTGCTTTTGGGGGCCAGTCTTTTACTGTCCATCGG
I M E I F I T G L L L G A S L L L S I G

ACCGCAGAATGTACTGGTGATTAAACAAGGAATTAAGCGCGAAGGACTCATTGCGGTTCT
P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L

TCTCGTGTGTTTAATTTCTGACGTCTTTTGTTCATCGCCGGCACCTTGGGCGTTGATCT
L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L

TTTGTTCAATGGCGCGCGGATCGTGCTCGATATTATGCGCTGGGGTGGCATCGCTTACCT
L S N A A P I V L D I M R W G G I A Y L

GTTATGGTTTGGCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAAGGTGGAAGCGCCACA
L W F A V M A A K D A M T N K V E A P Q

GATCATTGAAGAAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCCTTTGGGCGGTTTCGGCGGT
I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V

GGCCACTGACACGCGCAACCGGGTGCGGGTGGAGGTGAGCGTCGATAAGCAGCGGGTTTG
A T D T R N R V R V E V S V D K Q R V W

GGTAAAGCCCATGTTGATGGCAATCGTGCTGACCTGGTTGAACCCGAATGCGTATTTGGA
V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D

CGCGTTTGTGTTTATCGGCGGCGTGGCGCGCAATACGGCGACACCGGACGGTGGATTTT
A F V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F

CGCCGCTGGCGCGTTTCGCGGCAAGCCTGATCTGGTTCCCGCTGGTGGGTTTCGGCGCAGC
A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A

AGCATTGTCACGCCCCTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGCTGGATCAACGTCGTCGTGGC
A L S R P L S S P K V W R W I N V V V A

Tabelle 2 (fortgesetzt)

21

1740

/ orf3
- N E R T K

5 CTACTGGCGTAACCGGTAGTTTGACTACAACCTACCCAATCAAAAGCGCCCAAAA
AGTTGTGATGACCGCATTGGCCATCAAACCTGATGTTGATGGGTTAGTTTTTCGCGG 5
V V M T A L A I K L M L M G -
Lyse /

1800

CCTTAGCCACCGGAAGCGGGTTTACAACCTACGGCCGCAGCACCCCTTTAGAGTAGCTAGCG
S D T A K A W I N I G A D H S I E D I A

1860

GAGGTTGAGCCGCAGTCTTTTGAGGTTCAACAACCTCACTTAGTTCGACAAACAGGTGCGAC
E L E A D S F E L N N L S D L S N D L Q

1920

GAGTTGACTGCTTCGTGGTTAGTTACGTGACCAGTGCCATAGGCGCGGCATGAGAGGAAC
E V S S A G I L A S T V T D A G Y E G Q

1980

GAGCGCGTCGTGGGTACGTTTCGCGGTAGACGCGTTCACTGACGGGCGCAAGGACCCGCTA
E R L V W A L A M Q A L S Q G R E Q A I

2040

CAGTAACTCGAACGCCTGGTATAGTTATAACAAGTGCAAGTTGTACGGGAGTCTGTCCCT
D N L K R V M D I N N V N L M G E S L S

2100

GAATGGGACCGACCGCGCCCTTGGGAGACCTTAAGGTAGCTCTATAAACAGGCACTCGTC
K G Q S A R S G E P I G D L Y K D T L L

2160

CGGGACGCGTTCAACCACTCTTTCGTTACTGCGGTTCTGGTAACAACCGTCGACTGACGTT
G Q A L P S F A I V G L G N N A A S Q L

2220

GTTCAAGAGTGGCAGTAGCGGGCCAAGGAGGTGGGTTGCTAATTACTACCTTATCGAACC
L N E G D D G P E E V W R N I I S Y S P

2280

GACTACTTAGTCTTCGCCCCTCGGGAGGAGGCGGTACTTGAGTCGGCGGAGGCGACACTC
Q H I L L P C G E E A M F E A A E A T L

2340

GAGACCTGGCATCCTTCTTTATGGGTGCATTTCTCGGAAAGGTCTGCGTTGTTACAGTGC
E P G Y S S I G V Y L A K G S A V I D R

2374

<-orf3/

GTTACGCATGTACCAAAGAAGGTTTCCTCATAGA
L A Y M T E E L P T D

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Tabelle 3

1	<u>MVMEIFITG LLLGASLLS IGPQNVLVK QGIKREGLIA VLLVCLISDV</u>	
	TMH1	TMH2
51	<u>ELFIAGTLGV DLLSNAAPIV LDIMRWGGIA YLLWFAVMAA KDAMTNKVEA</u>	
		TMH3
101	<u>PQIEETEPT VPDDTPLGGS AVATDTRNRV RVEVSVDKQR VWVKPMLMAI</u>	
151	<u>VLTWLNPNAY LDAFVEFIGV GAQYGD TGRW IFAAGAFAS LIWFPLVGFG</u>	
	TMH4	TMH5
201	<u>AAALSRLSS PKVWRWINVV VAVVMTALAI KLMLMG</u>	
		TMH6

Forschungszentrum Jülich GmbH

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrier-Aktivität und/oder die Exportgen-Expression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die endogene Exportcarrier-Aktivität des Mikroorganismus erhöht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß durch Mutation des endogenen Exportgens ein Carrier mit höherer Export-Aktivität erzeugt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Genexpression des Exportcarriers durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Exportgen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl
eingebaut wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das
dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen
enthält.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die regulatorische Gensequenz eine für die in Tabelle 1
angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen
kodierende Nukleotidsequenz aufweist, ~~woher~~
9. Verfahren nach Anspruch 8,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von
Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im
wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweist, ~~woher~~
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender
Mikroorganismus mit dem das Exportgen enthaltende
Genkonstrukt transformiert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem
das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.



12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt
wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden
Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt
wird, der einen erhöhten Anteil an
Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Exportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm der
Gattung Corynebacterium isoliert wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Exportgensequenz durch Vergleich mit der Sequenz
eines bereits bekannten Exportgens identifiziert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die von der zu identifizierenden Exportgensequenz
abgeleitete Aminosäuresequenz mit der in Tabelle 3
angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen
verglichen wird, *wobei*.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Exportgen-Expression durch Verstärkung der
Transkriptionssignale erhöht wird.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß als Exportgen ein Gen mit einer für die in Tabelle 3
angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen
kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird, wobei
19. Verfahren nach Anspruch 18,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß als Exportgen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder einer im
wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur
Herstellung von L-Lysin.
21. Für einen Aminosäure-Exportcarrier kodierendes Exportgen.
22. Exportgen nach Anspruch 21 mit einer für die in Tabelle 3
angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen
kodierenden Nukleotidsequenz, wobei
23. Exportgen nach Anspruch 22 mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder einer im
wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz, wobei
24. Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 23 mit diesem
zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
25. Exportgen nach Anspruch 24,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die regulatorische Gensequenz eine für die in Tabelle 1
angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen
kodierende Nukleotidsequenz aufweist, wobei



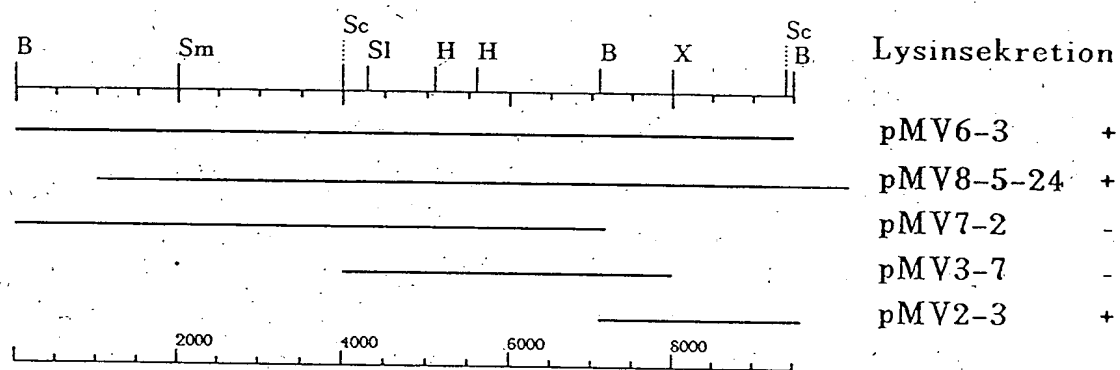
26. Exportgen nach Anspruch 25,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von
Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im
wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweist, ~~wobei~~.
27. Zur Regulation eines für einen Aminosäure-Exportcarrier.
kodierenden Exportgens geeignetes Regulatorgen mit einer für
die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren
Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz, ~~wobei~~.
28. Regulatorgen nach Anspruch 27 mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder einer im
wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz, ~~wobei~~.
29. Genstruktur, enthaltend ein Exportgen nach einem der
Ansprüche 21 bis 26.
30. Genstruktur, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach
Anspruch 27 oder 28.
31. Vektor, enthaltend ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21
bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29.
32. Vektor nach Anspruch 31 mit niedriger Kopienzahl.
33. Vektor, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach
Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30.
34. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein
Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine
Genstruktur nach Anspruch 29.
35. Transformierte Zelle nach Anspruch 34, enthaltend einen
Vektor nach Anspruch 31 oder 32.



36. Transformierte Zelle nach Anspruch 34 oder 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie der Gattung Corynebacterium angehört.
37. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß in dieser die an der Synthese beteiligten Enzyme der
Aminosäure, die mittels des Exportcarriers, für das das in
die transformierte Zelle übertragene Exportgen kodiert, aus
der Zelle ausgeschleust wird, dereguliert sind.
38. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen erhöhten Anteil an
Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
39. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form eine
regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine
Genstruktur nach Anspruch 30.
40. Transformierte Zelle nach Anspruch 39, enthaltend einen
Vektor nach Anspruch 33.
41. Für den Export von Aminosäuren geeignete Membranproteine mit
6 transmembranen Helices.
42. Membranprotein nach Anspruch 41 mit der in Tabelle 3
angegebenen Aminosäuresequenz, wobei Tabelle 3 Bestandteil
dieses Anspruches ist, ~~wobei~~
43. Verwendung eines Exportgens zur Steigerung der
Aminosäureproduktion von Mikroorganismen.



44. Verwendung nach Anspruch 43,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein mutiertes Exportgen, das für ein Enzym mit erhöhter
Exportcarrier-Aktivität kodiert, verwendet wird.
45. Verwendung nach Anspruch 43 oder 44,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Aminosäure-produzierende Mikroorganismus mit einem
Genkonstrukt, das ein Exportgen enthält, transformiert wird.
46. Verwendung nach Anspruch 45,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen
trägt.
47. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 46,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Exportgen aus *Corynebacterium* verwendet wird.
48. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 47,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus
Corynebacterium verwendet wird.



Figur 1

CgLyse 1 MVIMEIFITGLLLGASLLLSIGPONVLVIKQGIKREGLIAVLLVCLISDV 50
 EcYgga 1MILPLGPQNAFVMNQGIRROYHIMIALLCATSDL 34

CgLyse 51 FLFIAGTLGVDLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWFAVMAAKDAMTNKVEA 100
 EcYgga 35 VLICAGIFGGSALLMQSPWLLALVTWGGVAFLLWYGFGAFKTAMSSNIE. 83

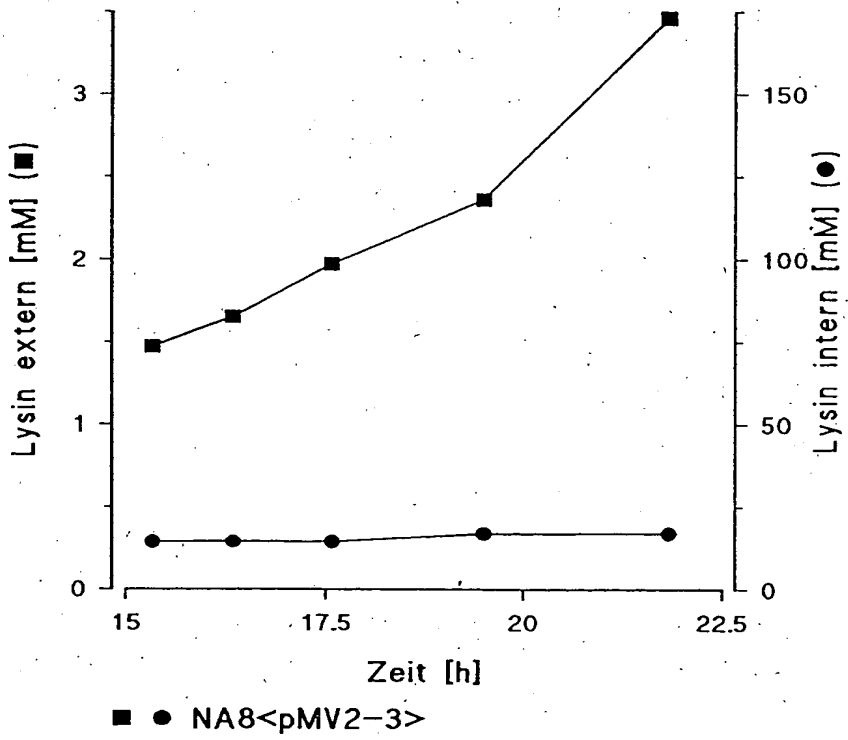
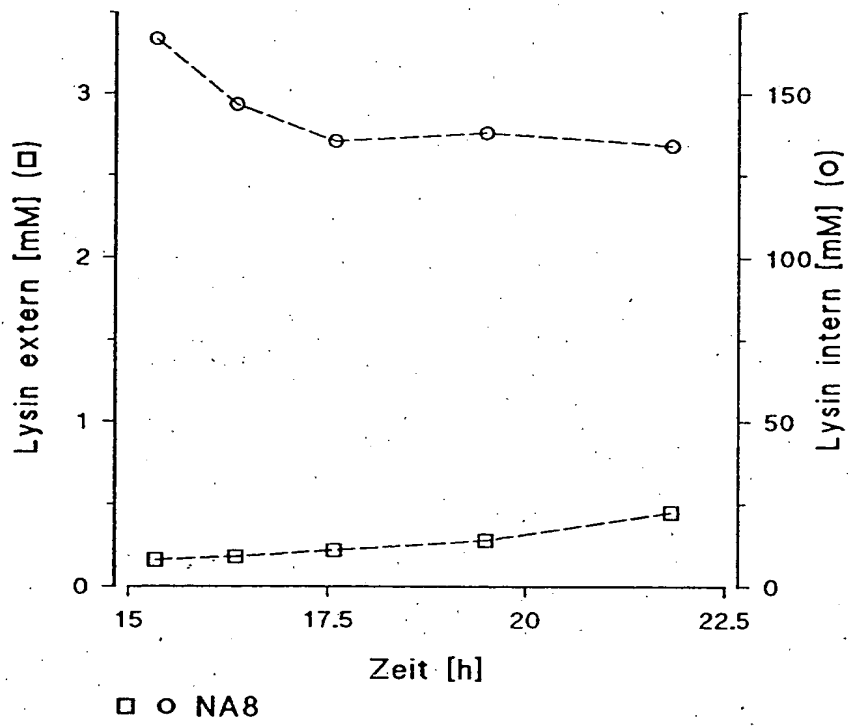
CgLyse 101 PQIIEETEPTVPDDTPLGGSAVATDTRNRVRVEVSVDKQRVWVKPMLMAI 150
 EcYgga 84LASAEVMKQGRWK.....IIATMLAV 104

CgLyse 151 VLTWLNPNAYLDAFVEFIGGVGAQYGDGTGRWIFAAGAFASLIWFPLVGFG 200
 EcYgga 105 ..TWLNPHVYLDTEFVVLGSLGGQLDVEPKRWFALGTISASFLWFFGLALL 152

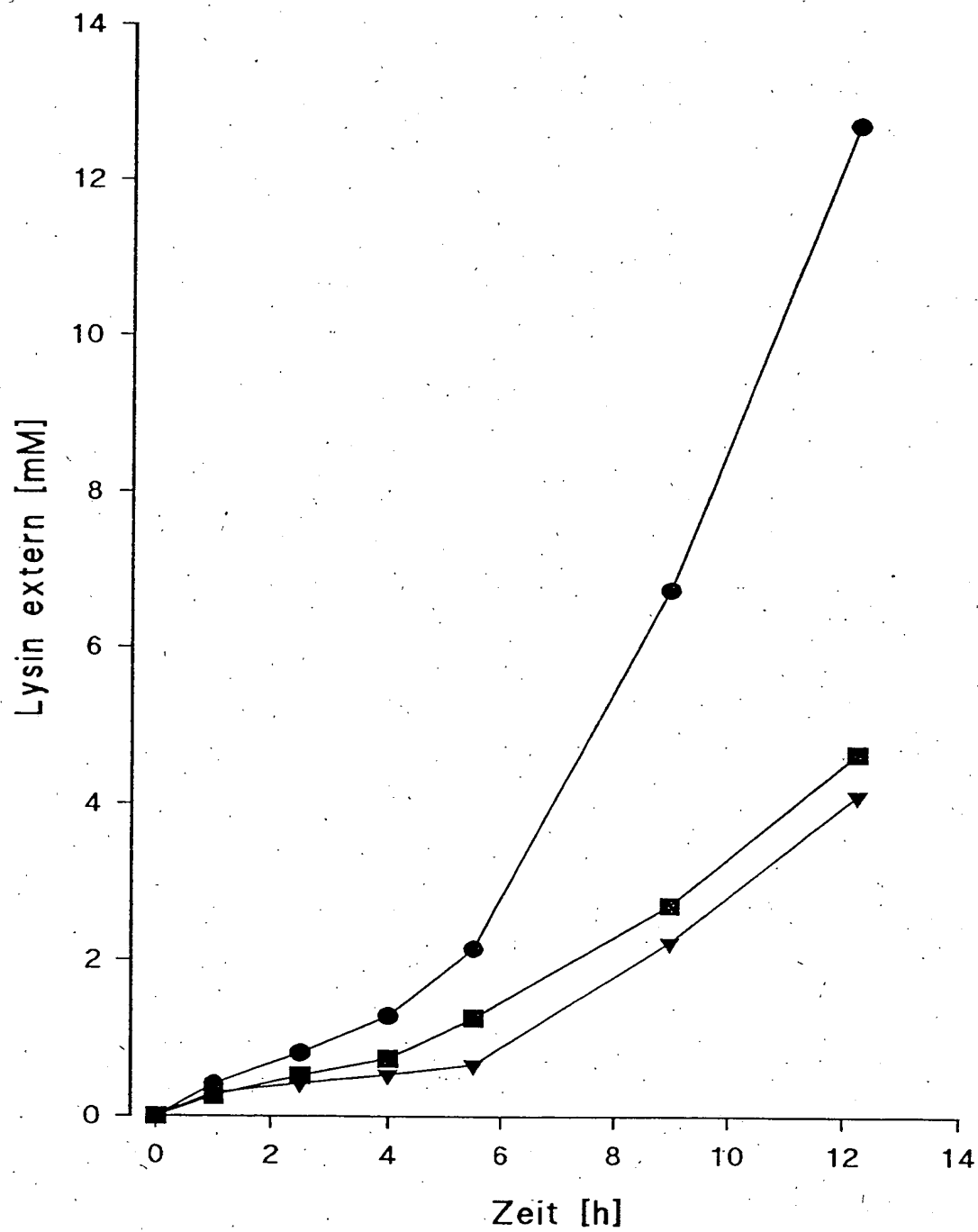
CgLyse 201 AAALSRPLSSPKVVRWINVVAVVMTALAIKMLMG..... 236
 EcYgga 153 AAWLAPRLRTAKAQRIINLVVGCVMWFIALQLARDGIAHAQALFS 197

Figur 2

Komplementation des Exportdefektes



Figur 3



Figur 4